

A maximum entrópia módszer alkalmazása abszorpciós kinetikai folyamatok értelmezésére

Doktori értekezés tézisei

Lukács András

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudomány Kar
Biológiai Fizika Tanszék

Témavezető: Dr. Papp Elemér, kandidátus, ny. egyetemi docens

ELTE TTK, Fizika Doktori Iskola

Statistikus fizika, biológiai fizika és kvantumrendszerek fizikája program

Iskolavezető: Prof. Horváth Zalán, az MTA rendes tagja, tanszékvezető
egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Kürti Jenő, az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi
tanár

Budapest, 2011

1. Bevezetés

A fotoszintézis kutatásnak az elmúlt 40 évben az egyik legfontosabb témája a *Halobacterium salinarium* nevű baktérium fényhasznosító rendszerének vizsgálata lett. Ebben az élőlényben a fényhasznosító rendszer a baktérium jól körülhatárolható helyein az úgynevezett bíbormembránon található, amely néhány lipidből és egyetlen integráns membránfehérjéből, a bakteriorodopszimból (BR) áll. Ez utóbbi fehérje fény hatására csak egy „egyszerű” protonpumpaként működik, és H^+ ionokat juttat a sejt belsejéből a külvilágba, hogy az így létrejött protongradiensben tárolt energiát mozgásra (fototaxis) és ATP szintézisre fordítsa, szemben a magasabb-rendű növények összetett fényhasznosító folyamataival.

Fény hatására a BR egy több lépéses reakcióciklusba kezd, melynek végén visszatér alapállapotba. Az ilyen ciklust nevezzük a BR fotociklusának. A fotociklus során létrejött állapotok spektrálisan is eltérő tulajdonságúak, a fény tehát egy olyan folyamatot indít el, mely a fehérje abszorpciós spektrumával is nyomon követhető. Az alapállapoton kívül 5 spektrálisan különböző állapotot sikerült azonosítani: K, L, M, N, O. A fotociklus első modelljét éppen ezen intermedierek közötti egyirányú reakciókkal írták le. A későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy bár ez a modell az összes spektrálisan megkülönböztethető állapotot jól leírja, de a játszódó folyamatok ennél jóval komplikáltabbak. Ennek egyik leglényegesebb pontja például az M állapot felépülése és bomlása, amely közben játszódik le a H^+ ion leadása az extracelluláris térbe és történik meg az az ún. "kapcsoló" lépés, mely lehetővé teszi a citoplazmából a Schiff-bázis reprotonálódását az Asp-96-on keresztül. Ezen állapot részletes analíziséből hamar fény derült arra, hogy több M forma létezik, melyek spektrálisan azonosak (legalább 2: M_1 , M_2). Már a 3-dik M állapotra is találtak bizonyítékokat: M_2').

Így egyre népszerűbbek lettek az 5 spektrálisan megkülönböztethető állapotnál több köztes állapotot feltételező soros reverzibilis modellek, melyek már több N, vagy O állapotot is tartalmaztak és jól magyarázták a kísérleti abszorpció kinetikai adatokat. Ettől függetlenül megjelentek más modellek is a több M állapot magyarázatára, például heterogén bakteriorodopszin alapállapotot feltételezve, vagy párhuzamosan futó fotociklusokat. A munka végzésének

idején a folyamatokat minden tekintetben a „legjobban” leíró fotociklus modell még nem állt rendelkezésre.

A bakteriorodopszin tulajdonságait jó pár éve próbálják kihasználni optikai kapcsolók létrehozásában. Ezen alkalmazásokban fontos szerepet játszik a fehérje törésmutatója is, illetve annak változása a fény hatására. Ezen effektusokat sok mérési módszerrel vizsgálták már: kritikus szög meghatározásán alapuló módszerrel, térben és spektrálisan bontott interferometria (SSRI) módszerével. Optikai fénymódusú hullámvezető spektroszkópia módszerrel is történtek vizsgálatok, de csak vastag minta esetén.

2. Célkitűzés

Mivel a bakteriorodopszin fotociklusának kinetikájára meglehetősen sok modell létezik, ezért munkám egyik konkrét céljaként azt tűztem ki, hogy olyan módszert alkalmazzak, mely segít minél függetlenebb módon közelebb jutni a sok lehetséges fotociklus modell közül a valóságot legjobban leíróhoz.

Ennek során bemutatom az abszorpció kinetikai jelek rögzítéséhez használt optikai spektrométert, valamint a nyers mérési adatok előfeldolgozásához szükséges eljárásokat. A munkám további részeként beszámolok az abszorpciós jelek mérésén alapuló kinetikai modell keresés korábbi módszereiről, azok hozadékairól, illetve hátrányairól. Ezután bemutatom a Maximum Entrópia Módszert (MEM), mint egy alternatív módszert a kinetikai modellek felállításához. E célból részletezem a módszer korábbi használatát, továbbá olyan általánosítását, amely alkalmassá teszi az abszorpciós kinetikai mérések kiértékelésére, valamint a módszer tesztelését. Végül beszámolok a MEM mérési adatokra való alkalmazásáról és ismertetem a konkrét fotociklus modellt, melyet a módszer legjobban támogat.

Munkám másik részét ugyancsak fény hasznosítását végző fehérjék (BR mellett egy magasabb rendű növényi fotoszintézisben szintén aktív részt vevő fehérje - növényi fény-gyűjtő komplex: LHCII) vizsgálata képezte. Itt azonban a fő cél a fehérjék optikai paramétereinek - törésmutató, vastagság - meghatározása volt a fényhasznosítási folyamataik során.

Az ehhez alkalmazott optikai hullámvezető berendezés és mérési módszer

rövid bemutatására mellett a BR törésmutató és vastagság mérések feldolgozásának újszerű menetét és a kapott értékeket is ismertetem a dolgozat másik felében.

3. Alkalmazott módszerek

A bakteriorodopszin fotociklusának vizsgálatát optikai spektrométer segítségével végeztük. A mintát Nd-YAG impulzus lézerrel gerjesztve különböző hullámhosszú mérőfényekkel átvilágítva rögzítettük a minta abszorpciójának változását néhány tized μ s-os időpillanattól a s-os tartományig két DSA (Digital Storage Adaptor) segítségével. A különböző időfelbontású DSA-k jeleit logaritmikus skálán 200 pontot egyenletesen megtartva állítottuk össze a későbbi analízisekhez használt abszorpciós mérési adatokat.

Az abszorpciós mérések újszerű analízisét a Maximum Entrópia Módszer segítségével végeztük. Bár MEM-et eredetileg asztrológiai képek feljavítására tervezték, már sikeresen használták több tudományterületen is, például: nagy időfelbontású fluoreszcens spektroszkópia, ligandumok kötési sebességének meghatározása. A módszer a kísérleti adatokat illesztő függvény paramétereiből képzett entrópiát maximalizálja, míg az illesztés négyzetes eltérését minimalizálja, azaz az összes jól illeszkedő megoldások közül egyet választ ki ezek alapján. A MEM tehát lehetőséget ad arra, hogy kísérleti adatokból meghatározzuk a folyamatra jellemző lehetséges látszólagos sebesség eloszlásokat függetlenül a kinetikai modelltől. Mivel a módszert korábban csak felfutó vagy csak lefutó sebességi eloszlásokkal leírható folyamatokra alkalmazták, nekünk alkalmassá kellett tennünk felfutó és lefutó sebességi állandókat egyszerre tartalmazó kísérleti adatokra, mert az abszorpció kinetikai jelek ilyenek.

A törésmutató és vastagság mérésekhez optikai fénymódusú hullámvezető spektroszkópiát (optical waveguide lighthmode spectroscopy, OWLS) alkalmazunk. Az OWLS szenzor két lényeges eleme az általában üveghordozóra felvitt néhány száz nanométer vastagságú és nagy törésmutatójú hullámvezető réteg (dielektrikum filmek) és az ezen kialakított optikai rács. A rácsot csak jól meghatározott szögben megvilágítva válik lehetővé, hogy a fény (általában lézer) a dielektrikum filmbe „behaladjon” és abban terjedjen. Mivel e hullám evan-

eszcens, ezért a terjedése érzékeny a hullámvezető film határfeltételeire. Ez teszi lehetővé, hogy a hullámvezetőt felületi érzékelőnek használják és meghatározhassák a felvitt anyag optikai paramétereit. Kis vastagságú BR minták esetén azonban a korábban alkalmazott törésmutató számolás nem adott jó eredményt, ezért kifejlesztésre került egy inverz módszer. Ha a hullámvezető optikai szerkezetét ismertnek tekintenénk (minden réteget, még a minta törésmutató és vastagságát is), akkor a Maxwell-egyenletek által meghatározott elektromos és mágneses térerősségek folytonossági határfeltételeit csak meghatározott effektív törésmutató értékek elégíthetnék ki, amelyek numerikus eljárással nagy pontossággal kiszámolhatóak. Ezután addig változtatjuk a numerikus számolás során a minta törésmutató és vastagság értékeit, míg a mért effektív törésmutató értékeket nem kapjuk vissza. Így meghatározhatóvá vált kis vastagságú BR és LHCII rétegek törésmutatója is.

4. Tézispontok

(1) A munkánk során először a BR fotociklusának elemzésével foglalkoztunk. Megmutattuk, hogy a korábban csak pozitív amplitúdójú élettartam eloszlásokra alkalmazott Maximum Entrópia Módszert sikeresen lehet adaptálni felfutó és lefutó exponenciálisokból álló abszorpciók kinetikai mérések elemzésére. Ennek során generált adatok segítségével bebizonyosodott, hogy a „belső” tulajdonságokból és zajból származó entrópiát el lehet különíteni. A zaj lényegesen csak akkor változtatja meg az entrópiát, ha az élettartam eloszlás keskeny [1]. Több különböző hullámhosszra számolt abszorpciók adatokra történt illesztésen keresztül bebizonyítottam, hogy a MEM képes adott fotociklus modell főbb jellemzőinek következetes meghatározására is [2].

(2) Valós fotociklus méréseket analizálva a MEM-el, kiderült, hogy a BR kinetikája széles élettartam eloszlásokat, azaz nagy „belső” entrópiát adott. Ez az előbbieket szerintem nem az alkalmazott numerikus módszerből (MEM) ered, hanem a fehérje dinamikájával vagy a heterogenitásával kapcsolatos. Ez fontos bizonyíték ahhoz, hogy a diszkrét sebességi állandókkal leírható modellek mindenképpen csak a valós fotociklus közelítését jelentik [1,2].

(3) Az előbbi megállapítás ellenére a több hullámhosszon mért abszorpciós mérések MEM illesztéseinek eredményeihez megpróbáltam megkeresni a lehető legjobban illeszkedő diszkrét sebességi állandókkal jellemezhető fotociklus modellt. Először megmutattuk, hogy legalább 8 köztes állapot létezik a BR fotociklusában széles pH értékeken, ami támogatta az akkoriban újonnan megjelent 8 köztes állapotú modellek létjogosultságát. Rengeteg modell ki-próbálása után egy 4M állapotot tartalmazó elágazó kinetikai modell mellett érveltünk a MEM eredményei alapján. Ezen eredmény létjogosultságát a MEM eredményeire való illesztés jósága mellett a kapott sebességi állandók Arrhenius ábrázolásával és a köztes állapotok koncentrációjának közvetlen számolásával is alátámasztottuk [2].

(4) A munkánk további részében optikai hullámvezetők segítségével vizsgáltuk a bíbormembrán és LHCII rétegek optikai paramétereit széles rétegvastagság tartományban (20 nm-től néhány száz nm-ig). Kimutattuk, hogy a korábban alkalmazott közelítő módszer, a 4-rétegű módusegyenlet nagy hibát ad az optikai paraméterek kiszámításánál kis vastagságú BR rétegeknél. A Maxwell-egyenletek segítségével numerikus eljárással az effektív törésmutatók nagy pontossággal számolhatóak. Az ezen alapuló inverz módszer jó alkalmazhatóságát támasztottam alá kísérletekkel kis vastagságú minták esetére [3].

(5) A módszer segítségével megmértem a bíbormembrán ($n_A = 1.53 \pm 0.01$) és LHCII ($n_A = 1.54 \pm 0.01$) törésmutatóját, ami jól egyezett az eddigi irodalmi adatokkal [3].

(6) Két lézer segítségével megvizsgáltam a bíbormembrán és LHCII rétegekben a megvilágítás hatására bekövetkezett reverzibilis és irreverzibilis átalakulásokat. Ezek a változások a mért OWLS spektrumokban is megjelennek. A bíbormembrán rétegek törésmutatója, vastagsága és abszorpciója nagyon kis mértékben változik meg, de ez lock-in technika alkalmazásával mégis kimérhető. A bíbormembránon így mértem meg a $\Delta n \approx 0.002$ nagyságú törésmutató változást is. Megmértem az LHCII réteg hosszabb megvilágítás

hatására irreverzibilis törésmutató változását, melynek termo-optikai eredete lehet. A változás során a réteg törésmutatója $\Delta n \approx 0.002$ -al megnő és ~ 34 nm-el lecsökken annak vastagsága [3].

5. Következtetések

A fotociklus nem írható le tisztán reverzibilis soros kinetikai modellel, hanem annál bonyolultabb a pontos „szerkezete”, valamint a BR minta törésmutatója egyértelműen megváltozik az M állapot során.

A tézisek alapjául szolgáló publikációk

- [1] Ablonczy Zs., Lukács A., Papp E., „Application of the maximum entropy method to absorption kinetic rate process”, *Biophys. Chem.*, 104 (2003) 249–258.
- [2] Lukács A., Papp E., „Bacteriorhodopsin photocycle kinetics analyzed by the maximum entropy method”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 77 (2004) 1-16.
- [3] Lukács A., Garab G., Papp E., „Measurement of the optical parameters of purple membrane and plant light-harvesting complex films with optical waveguide lightmode spectroscopy”, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1606-1612.